

10/542161

Rec'd PCT/R 14 JUL 2005

542,161

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2004年8月12日 (12.08.2004)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2004/067741 A1

(51)国際特許分類7: C12N 15/09, C07K 14/47, 16/18,
C12Q 1/02, 1/68, A61K 38/17, 45/00, A61P 15/00, 43/00

(MIYAMOTO,Kaoru) [JP/JP]; 〒910-0337 福井県坂
井郡丸岡町新鳴鹿2丁目111 Fukui (JP). 水谷 哲
也 (MIZUTANI,Tetsuya) [JP/JP]; 〒910-0337 福井県
坂井郡丸岡町新鳴鹿2丁目100 Fukui (JP). 梶谷 宇
(KAJITANI,Takashi) [JP/JP]; 〒910-1117 福井県吉田
郡松岡町神明1-140 Fukui (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP2003/009165

(22)国際出願日: 2003年7月18日 (18.07.2003)

(25)国際出願の言語: 日本語

(74)代理人: 下田 昭, 外 (SHIMODA,Akira et al.); 〒104-
0031 東京都中央区京橋3-3-4 京橋日英ビル4階 Tokyo
(JP).

(26)国際公開の言語: 日本語

(81)指定国(国内): CA, US.

(30)優先権データ:
特願2003-18343 2003年1月28日 (28.01.2003) JP

(84)指定国(広域): ヨーロッパ特許 (DE, FR, GB, SE).

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立
行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND
TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉
県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72)発明者; および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 宮本 薫

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR

A1 (54)発明の名称: 転写活性化因子

WO 2004/067741 A1 (57) Abstract: It is intended to provide a novel transcriptional activator GCX-1 which is specific to a reproductive organ and seemingly plays an important role in the hypothalamus-pituitary-gonad axis. A novel gene GCX-1 (SEQ ID NO:2) overexpressed in the ovarian is isolated from a rat ovarian granulocyte cDNA library. By examining an abnormality in this gene and its gene product (SEQ ID NO:1) or an abnormality in the production thereof or developing a drug acting on its transcriptional activation region, it is possible to clarify causes of diseases induced by abnormalities in reproductive organs (for example, infertility, polycystic ovary diseases, endometriosis, pubertas praecox and osteoporosis) and treat these diseases.

(57)要約: 生殖組織に特異的であり、視床下部-下垂体-生殖腺軸中で重要な役割を有していると考えられる新規な
転写因子GCX-1を提供する。卵巣中に卓越して発現している新規遺伝子GCX-1(配列番号2)をラットの卵巣顆
粒細胞のcDNAライブラリーから単離した。この遺伝子及び遺伝子産物(配列番号1)の異常あるいは产生異常を
調べたり、この転写活性化領域に作用する薬剤を開発すれば、不妊症、多のう胞性卵胞症候群、子宮内膜症、思春
期早発症、骨粗しょう症等の生殖系器官の異常に起因する疾患の原因究明と治療が可能である。

明細書

転写活性化因子

5 技術分野

この発明は、転写活性化因子に関し、より詳細には、生殖系器官に特異的に発現する転写活性化因子G C X - 1に関する。

従来技術

10 卵巣における特定の現象、即ち卵胞形成、排卵、又はステロイド産生のような現象はその組織における遺伝子発現に完全に依存している。卵巣における機能と遺伝子の関係を解明するために多くの研究が行われてきた (Endocr Rev 15: 725-751 (1994); Mol Cell Endocrinol 163: 61-66 (2000); Endocrinology 142: 2184-2193 (2001); Trends Endocrinol Metab 13: 15 1 69-173 (2002); Biol Reprod 67: 900-910 (2002))。

発明者らは、卵胞発育の分子的メカニズムに焦点を当てて、ゴナドトロピンにより誘導される多くの卵巣の遺伝子を同定した (Biochem Biophys Res Commun 230: 518-523 (1997); J Biol Chem 275: 22512-22519 (2000); Biol Reprod 64: 1315-1319 (2001); Biol Reprod 66: 1813-1819 20 (2002); Sekiguchi T et. al., Transcriptional regulation of epiregulin gene in the rat ovary. Endocrinology in press.)。ゴナドトロピン処置によりラットの卵巣中に強く誘導される新規の転写抑制因子を最近報告し、GIOT-1 (gonadotropin-inducible ovarian transcription factor-1) と命名した (Mol Endocrinol 15: 1693-1705 25 (2001))。次いで、発明者らは GIOT-1 の生理学的機能を明らかにするために、卵巣において GIOT-1 と相互作用を示す蛋白を同定する試みを行い、転写性の調節補助因子 TIF1 β (transcriptional intermediary factor 1 β 、Proc Natl Acad Sci USA 93: 1422-1426 (2001); Mol Cell Biol 18: 5880-5887 (1998); Genes Dev 15: 3023-3038 (2001)) と転写調節因子

RIC (rat homologs of human I-mfa domain containing protein, J Biol Chem 275: 4848-4857 (2000)) が GIOT-1 と相互作用を示すことを報告した (Mol Endocrinol 15: 1693-1705 (2001))。

生殖組織中に発現することが知られている転写因子として Ad4BP/SF-1 と DAX-1 がある (Endocr Rev 18: 361-377 (1997); Recent Prog Horm Res 51: 241-260 (1996); Mol Endocrinol 10: 1261-1272 (1996))。 Ad4BP/SF-1 は、ステロイド産生酵素、StAR 又は GIOT-1 などを含むステロイド産生と関連する多くの遺伝子を調節している。また胚形成中の生殖システムの発育において、Ad4BP/SF-1 は重要な役割を演じている。DAX-1 も Ad4BP/SF-1 の機能と拮抗することによりその組織の発育に関与している。しかし、これらの因子は副腎腺中にも発現しており、副腎腺の発育にも関与しているため、生殖系器官特異的ではない。

発明が解決しようとする課題

本発明は、生殖組織中に発現する転写因子である Ad4BP/SF-1 や DAX-1 (Endocr Rev 18: 361-377 (1997); Recent Prog Horm Res 51: 241-260 (1996); Mol Endocrinol 10: 1261-1272 (1996)) とは異なり、生殖組織に特異的であり、視床下部一下垂体一生殖腺軸中で重要な役割を有していると考えられる新規な転写因子 GCX-1 を提供する。

20

課題を解決するための手段

発明者らは、生殖組織における転写因子の研究 (Mol Endocrinol 15: 1693-1705 (2001)) の過程において、ラットの卵巣顆粒膜細胞 cDNA ライブライ一から、HMG-box ドメインを含有する転写因子様蛋白をコード化する新規のクローンを単離した。発明者らは、この新規遺伝子 GCX-1 (agranulosa cell HMG-box protein-1、配列番号 2) を単離し、GCX-1 の構造と分布を決定し、GCX-1 の生殖系、特に卵巣における役割を解明するために、その遺伝子の機能を解析した。また GCX-1 の発現パターンについて実験し、GCX-1 蛋白は生殖と関連する組織、即ち、視床下部、下垂体、生殖腺、子宮においてのみ発現している

ことを見出し、更に GCX-1 蛋白が核内に局在していることを見出した。更に発明者らは GAL4 を基本とする非相同性検定法を用いて、GCX-1 が遺伝子転写を活性化することを確認した。

即ち、本発明は、以下の (a) 又は (b) から成る転写活性化因子である。

5 (a) 配列番号 1 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、転写活性化能を有するタンパク質

この転写活性化能は視床下部、下垂体、生殖腺、子宮などの生殖に関連する組織における転写活性化能をいい、レポーター遺伝子を用いた公知の方法により知

10 ることができる。

また、遺伝子治療の目的で、この因子を生殖系細胞に導入し、細胞内での転写を活性化することができる。従って、本発明は、この転写活性化因子を有効成分とする、転写活性化を目的とする薬剤である。

更に、本発明は、この転写活性化因子を特異的に認識し結合することができる
15 抗体又はアンタゴニストである。

この抗体は、本発明の転写活性化因子又はその活性部分をマウスなどの適当な動物に投与して、免疫反応を起こさせ、脾臓などの抗体産生組織から採取することができる。

また、このアンタゴニストは、例えば、本発明の転写活性化因子又はその活性部分から予想される立体構造から、結合可能な化合物をスクリーニングすること、又は、本発明の転写活性化因子又はその活性部分と結合するペプチドライブラーイを 2 ハイブリッドシステムを用いてスクリーニングすることにより、取得することができる。

また、このアミノ酸配列を認識する抗体を作成し、患者の卵巣顆粒膜細胞（これは体外受精の治療の際に卵とともに採取されてくるので利用可能）での量を調べることにより、GCX-1 の產生異常を知ることができる。

即ち、本発明は、被検者から生殖系器官の組織を採取する段階、及び採取した細胞に対する上記抗体又はアンタゴニストの反応性を調べる段階から成る、生殖系器官の異常に起因する疾患の検査方法である。

ここで生殖系器官とは視床下部、下垂体、生殖腺、子宮などをいい、生殖系器官の異常に起因する疾患とは、不妊症、多のう胞性卵胞症候群、子宮内膜症、思春期早発症、骨粗しょう症等をいう。

また、本発明は上記抗体又はアンタゴニストを有効成分とする、転写活性化を目的とする薬剤のスクリーニング剤である。

更に、本発明は、以下の（a）又は（b）から成る転写活性化因子（GCX-1）の遺伝子である。

（a）配列番号2の塩基配列から成るDNA

（b）配列番号1のアミノ酸配列から成るタンパク質、又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り転写活性化能を有するタンパク質をコードするDNA

この転写活性化能は、例えば、実施例5に記載した方法により、この遺伝子と共に適当なレポーター遺伝子を適当な細胞に導入して該レポーター遺伝子の発現を調べることにより知ることができる。

また、患者の白血球からゲノムDNAを分離し、GCX-1の塩基配列に異常があるかどうかを調べることができる。

即ち、本発明は、被検者から上記遺伝子に相当する部分を含むDNAを採取する段階、及び採取したDNAをこの遺伝子の塩基配列と比較する段階から成る、生殖系器官の異常に起因する疾患の検査方法である。

20

図面の簡単な説明

第1図は、GCX-1の推定アミノ酸配列（配列番号1）を示す。下線は推定上の核局在信号（NLS）部位を示し、太線は推定上のHMG-boxドメインを示す。

第2図は、ラットにおけるGCX-1の遺伝子発現を示す。

25 第3図は、ラット卵巣中のGCX-1のin situ融合化を示す。左図は明視野観察、右図は暗視野を示し、目盛り線は0.2mmを示す。

第4図は、内因性GCX-1蛋白の同定を示す。

第5図は、GCX-1は転写活性化因子であることを示す。各測定値は、4回の独立した移入実験における平均値とSDで示す。

第6図は、GCX-1の相互活性化ドメインの決定を示す。各測定値は4回の独立した移入実験における平均値とそのSDで示している。

発明の実施の形態

- 5 本発明者らは、卵巣中に卓越して発現している新規遺伝子 GCX-1 をラットの卵巣顆粒細胞の cDNA ライブラリーから単離した(実施例1)。GCX-1 遺伝子は、既によく研究されている DNA 結合モチーフの一種であり、酵母から哺乳類まで全ての真核生物に広く分布している HMG-box モチーフを含む蛋白をコードしている。
- 10 HMG-box は酵母から哺乳類まで真核生物に広く分布している DNA 結合モチーフの一つであり (Trends Genet 10: 94-100 (1994); Trends Biochem Sci 26: 163-174 (2001))、多くの HMG-box 含有蛋白は、各種の生理学的現象、例えば rRNA 転写調節因子としての UBF (Science 241: 1192-1197 (1988); Nature 344: 830-836 (1990))、性決定に必須の蛋白としての SRY (Nature 15 346: 240-244 (1990); Nature 346: 245-250 (1990))、T 細胞分化調節因子としての TCF (Nature 374: 70-74 (1995)) と TOX (Nature Immunol 3: 272-280 (2002)) などの重要な役割を演じていることが知られている。更に、ある種の HMG-box 含有蛋白が転写調節物質としてではなく、細胞内の信号伝達物質として機能していることが最近報告された (Science 1999 285: 20 248-251 (1999); J Exp Med 192: 565-570 (2000); Nature 418: 191-195 (2002))。加えて、HMG-box 蛋白が核のステロイドホルモン受容体と反応し、転写補助因子として作用することが報告されてきた (Mol Cell Biol 18: 4471-4487 (1998); Steroids 64: 576-586 (1999))。そのために、HMG-box 蛋白は生殖一内分泌系の生物学的機能に強く関与していると考えられる。
- 25 HMG-box モチーフを有する蛋白は、DNA 結合様式により大まかに2群に分けられる。SRY 又は TCF のような1群の蛋白はそれらの標的遺伝子上の特定の DNA 配列を認識する。HMGB1、UBF などの他の群に所属する蛋白は、非特異的 DNA 結合能を示す。前者の蛋白は1個の HMG-box モチーフのみを有するが、後者の蛋白

白は2個又はそれ以上の HMG-box モチーフを有している (Mol Endocrinol 10: 1261-1272 (1996); Trends Genet 10: 94-100 (1994))。

GCX-1 は特定のタイプの HMG-box 蛋白のように1個の HMG-box モチーフしか持たないが (実施例1)、GCX-1 の HMG-box 内のアミノ酸配列は、非特異的タイプの HMG-box 蛋白 (Trends Genet 10: 94-100 (1994); Trends Biochem Sci 26: 163-174 (2001)) の配列と低いが有意な類似性を示しており、特異的タイプの蛋白とは明らかに類似性がない。それ故に、GCX-1 は新規タイプの HMG-box 蛋白に属すると考えられる。

GCX-1 の遺伝子発現は、卵巣、睾丸、下垂体、視床下部に限定されていることから、GCX-1 は視床下部一下垂体一生殖腺軸で作用していると考えられる (実施例2)。同様に転写因子である Ad4BP/SF-1 と DAX-1 はステロイド産生と内分泌組織の胚発育に必須であり、GCX-1 と類似した遺伝子発現パターンを示す (Endocr Rev 18: 361-377 (1997); Recent Prog Horm Res 51: 241-260 (1996); Mol Endocrinol 10: 1261-1272 (1996))。しかし、これらの遺伝子は、GCX-1 が全く発現していない副腎腺でも発現しており、生殖組織中のみ発現している転写因子は今までに知られていない。一方、P450 アロマターゼ (Endocr Rev 15: 342-355 (1994)) と I型 17β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素をコード化する遺伝子 (Mol Cell Endocrinol 171: 71-76 (2001); Endocr Rev 18: 281-305 (1997)) は生殖組織中にのみ発現していることが知られているが、これらは下垂体中では発現していない。それ故に、GCX-1 は視床下部一下垂体一生殖腺システムにおいて重要な役割を演じていると考えられる。

in situ 融合研究により GCX-1 の遺伝子発現はステロイド産生活性が未だ非常に低い、早期段階の卵胞の顆粒細胞に限定していることが明らかになった (実施例3)。そして、GCX-1 の遺伝子発現が他のステロイド産生組織である副腎腺又は胎盤では見られなかったという所見は、GCX-1 がステロイドホルモンの生合成において重要な役割をしていないことを示唆している。むしろ、それは生殖組織の胚発育又は早期段階の卵胞の成長と発育においてある役割を演じていると考えられる。早期段階の卵胞における現象はゴナドトロピン刺激に依存していないと思われている。顆粒膜細胞中においてゴナドトロピンにより GCX-1 の誘導が

ないという所見は、上の推測と一致していると考えられる。

GCX-1 のウエスターントロッティング解析により、GCX-1 遺伝子産物は卵巣の顆粒細胞の核内に実際に存在していることが明らかになり、GFP 融合蛋白解析により、推定上の NLS モチーフは GCX-1 の核内転座に必須であることが明らか 5 となつた（結果は省略する。）。加えて、GAL4 融合蛋白を基本とする非相同性レポーター検定法により、GCX-1 は強力な転写活性化因子であることが明らかとなつた。これらのデータは GCX-1 は生殖組織中で転写活性化因子として作用することを示唆している。GCX-1 の活性化ドメインを N 末端から 25-63 個の残基間の部位であることを示した。GCX-1 は夫々セリン、プロリン、リジン残基が豊富 10 部位も有しているが、これらの部位は転写活性には不要であった。活性化ドメインは LXXLL のような典型的な転写活性化モチーフ（Genes Dev 12: 3357-3368 (1998); Cell 108: 465-474 (2002); Endocrinology 143: 2461-2465 (2002)）を有していないが、その部位は疎水性アミノ酸残基が豊富で且つ LXXLL 様の配列を有している。LXXLL モチーフは核のステロイドホルモン受容体又は核内の相互活性化因子との相互作用に必要であることが知られている。しかし、発明者らは GCX-1 活性化ドメインと数種の既知の相互活性化因子 15 間での相互作用を確認できなかつた（データは示さない。）。位置特定変異解析の結果から、発明者らは、完全な活性を示すためには GCX-1 活性化ドメインの全体構造が必要であるに違ないと結論した。GCX-1 活性化ドメインの二次又は三次構造に関する情報はほとんどないが、上記の所見は GCX-1 活性化ドメインは新規タイプの相互活性化ドメインであることを示している。

発明の効果

本発明の遺伝子（配列番号 2）及び遺伝子産物（配列番号 1）は生殖系のみに 25 発現しており、特に卵巣で強く発現するため、排卵障害やステロイドホルモン産生異常の原因ともなりうることから、この遺伝子の異常あるいは産生異常を調べることにより、不妊症、多のう胞性卵胞症候群、子宮内膜症、思春期早発症、骨粗しょう症等の生殖系器官の異常に起因する疾患の原因究明と治療に利用できる。またアミノ酸配列（配列番号 1）中の転写活性化領域に作用する薬剤を開発す

れば、それは上記疾患の治療薬となる。

以下、実施例により本発明を例証するが、これらは本発明を制限することを意図したものではない。

5

実施例 1

まず、ラット顆粒膜細胞を培養した。未成熟の Wistar ラット（21 日齢）を使用した。ごま油 0.1ml 中にジエチルスチルベストロール（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）2mg を加え、1 日 1 回、4 日間処置することにより卵巣顆粒膜細胞の増殖を刺激した。當時、国立衛生研究所のガイドラインに従って動物を処置した。卵巣を切開し、26 ゲージの針を用いて卵胞を穿刺することにより顆粒膜細胞を分離し、分離した顆粒細胞を集めた。細胞を洗浄し、室温、5 分間 500g×5 の簡単な遠心により細胞を採取し、トリパンブルー染色により生存性を調べた。細胞生存率は 90% 以上であった。その後、顆粒膜細胞をコラーゲン処理したプレート上に抗生物質と 0.1% BSA を添加した Ham F-12:Dulbecco の修正 Eagle 培地（1:1, v:v）中に入れ、炭酸ガス 5% と空気 95% を含む加湿混合ガス内で 37°C 下で培養した。

次に、酵母 2 種融合スクリーニングを行った。酵母 2 種融合システムには CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA) から購入したキットを用いた。全ての実験手順は、特記した以外は製造元の指示書に従って実施した。

酵母 2 種融合システムのための親ベクターである pGBKT7 ベクターは酵母内で GAL4 DBD 融合蛋白を発現する。誘導プラスミドである pGBKT7-GIOT-1 ベクターは以前記述した方法（Mol Endocrinol 15: 1693-1705 (2001)）により作製した。TE/LiOAc を基本とした高効率形質転換法（Biotechniques 24: 596-600 (1998) 参照）を用いて、この誘導プラスミドにより AH109 細胞を形質転換させた。酵母 2 種融合スクリーニングのためにラット顆粒膜細胞からプラスミド cDNA ライブライリーを、既報（Biol Reprod 64: 1315-1319 (2001) 参照）に従って、作製した。pGBKT7-GIOT-1 を有する酵母をライブライリーにより形質転換し、約 7×10^6 個の最初の形質転換した細胞を得た。次いで全てのク

ローンをスクリーニングし、7種の HIS3⁺/ADE2⁺/MEL1⁺陽性クローンを得た。 Big Dye ターミネーターFS サイクル配列化キットと 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Japan) を用いてヌクレオチド配列解析を行い、次いで GenBank DNA データベースを用いて同一性検索を行うことにより全てのクローンの特徴を調べた。データベースを用いた検索により、4種のクローンのヌクレオチド配列は既知の蛋白をコード化する遺伝子 (Mol Endocrinol 15: 1693-1705 (2001)) と高い類似性を有し、他の3種クローンは新規の蛋白をコード化することが判明した。この3種の新規クローンから、pACT2-GCX-1 と名付けられ、HMG-box モチーフを有する 1219-bp を含むプラスミドを単離した。

更に解析を行うために、758-bp EcoRI/BamHI 断片 (nt-160/597) を pBluescript II SK (+) ベクター (stratagene, La Jolla, CA) の EcoRI/BamHI 部位へサブクローニングし、得られたプラスミドを pBS-GCX-1 と命名した。

次に、λ-ファージ cDNA ライブラリーの作製と全配列 GCX-1 cDNA のクローニングを行った。TRIzol 試薬 (Invitrogen, Groningen, Netherlands) を用いて、ヒツジ FSH (National Hormone and Pituitary Distribution Program, Bethesda, MD) 30ng/ml を 3 時間処置して、顆粒膜細胞から全 RNA を作製した。oligotex dT-30 super (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) を用いて poly(A)⁺-RNA を単離した。oligo-dT をプライマーとし、cDNA 合成システムと Superscript II (Invitrogen) を用いて 15 μg の poly(A)⁺-RNA から cDNA を合成した。EcoRI/NotI アダプターを二本鎖 cDNA に結合させ、両端を T4 ポリヌクレオチドキナーゼにより磷酸化した。その cDNA を λ ZAP Express ファージアーム (Stratagene) に結合させ、Gigapack III gold (Stratagene) を用いて *in vitro* で包括することにより、cDNA ライブラリーを作製した。その cDNA ライブラリーは 1×10⁷ 個の独立したクローンを含んでいた。

GCX-1 に対応する全配列 cDNA を単離するために、ライブラリーを BcaBest DNA 標識キット(宝バイオメディカルス)により標識された pBS-GTX-1 の 758-bp α-³²P dCTP 標識 EcoRI/BamHI 断片を用いてスクリーニングした。約 60,000 種

の cDNA クローンから 11 種の陽性のクローンを単離した。

この蛋白をコード化する完全な cDNA クローンを単離するために、単離クローンをプローブとして用いることによりその cDNA ライブラリーを再びスクリーニングし、473 個のアミノ酸の蛋白をコード化する遺伝子の完全な cDNA クローンを得た（配列番号 2）。この塩基配列からアミノ酸配列（配列番号 1）を得た。

第 1 図に示すように、この蛋白は蛋白中心部に 1 個の HMG-box モチーフ（配列番号 1 のアミノ酸配列の 205-272 位）を有している。そのために、発明者らはそれを GCX-1 (granulosa cell HMG-box protein-1) と呼ぶ。その蛋白は HMG-box の N 末端に 1 個の NLS (nuclear localization signal) 様モチーフ（配列番号 1 のアミノ酸配列の 180-199 位）と夫々セリン高含有部位（配列番号 1 のアミノ酸配列の 124-164 位）、プロリン高含有部位（配列番号 1 のアミノ酸配列の 348-431 位）、リジン高含有部位（配列番号 1 のアミノ酸配列の 180-199 位）から成る 3 個のドメインも有している。これらの構造的特徴は転写調節因子に典型的なものである。

10

15

実施例 2

GCX-1 の組織分存を調べるために、21 日齢のラットの各種の組織について RT-PCR をを行い、ノーザンプロット解析を行った。

21 日齢の雌ラットを PMSG (帝国臓器株式会社) 30IU 又は hCG (三共株式会社) 50IU で感作し、卵巣を記述した時間に採取した。未成熟雌ラットの各種組織（視床下部、下垂体、小脳、副腎腺、腎臓、脾臓、腸管、肝臓、子宮及び卵巣）と未成熟雄ラットの睾丸から、TRIzol 試薬を用いて全 RNA を抽出した。ノーザンプロット解析のために、 $10 \mu\text{g}$ の全 RNA を 1% 変性アガロースゲル上で電気泳動により分離し、ナイロン膜 (Biodyne, ICN Biomedicals, Inc., Glen Cove, NY) に移し、UV 照射により交差結合させた。前融合と融合を行うために、ExpressHyb ハイブリダイゼーション液 (CLONTECH) を用いた。既に記述した pBS-GCX-1 の 758-bp 放射線標識 EcoRI/BamHI 断片又はラット USF-2 (上流刺激因子) の 1.4-kbp α - ^{32}P dCTP 標識 BamHI 断片をプローブとして使用した。前融合、融合及び洗浄法に関する条件は、提供者から得たプロトコールに従

って実施した。プロットを FUJIX 映像板（富士写真フィルム）に曝露した。融合信号を FUJIX BAS-2000 画像解析装置を用いて検出した。RT-PCR を行うために、 $5 \mu\text{g}$ の全 RNA を逆転写し、反応混合液の一部（1/100）を PCR 反応に使用した。プライマーとして 5'-CCCAATGAGCCACAGAAGCCA-3' (5'-プライマー : nt 589/609、配列番号 3) と 5'-GGAAAGCCTGCAGGTCGGAG-3' (3'-プライマー : nt 936/955、配列番号 4) を用いた。反応条件として、FastStart Taq DNA Polymerase (Roche) を用いて 20 秒間 94°Cで変性、30 秒間 55°Cでアニールし、45 秒間 72°Cで伸展する操作を 30 回行った。1.5%アガロースゲル上で PCR 産物 $10 \mu\text{l}$ を電気泳動し、次いで臭化エチジウム (EtBr) 染色により可視化した。その結果を第 2 図に示す。

GCX-1 遺伝子の発現は、視床下部 (hypothalamus)、下垂体 (pituitary)、睾丸 (testis)、子宮 (uterus) 及び卵巣 (ovary) などの、の限定された組織中において検出された。GCX-1 の発現は卵巣中で最も高かったが、副腎腺 (adrenal) と胎盤 (データは示していない) 中では発現が見られなかった。このことは、GCX-1 は視床下部一下垂体一生殖腺軸上で作用していることを強く示唆している。

実施例 3

in situ 融合法により卵胞発育の各段階での GCX-1 の発現について調べた。
アンチセンスプローブ作製のために、EcoRI により直線化された pBS-GCX-1 を *in vitro* で T3 RNA ポリメラーゼ (Roche) と α -³⁵S CTP により転写した。T7RNA ポリメラーゼ (Roche) と α -³⁵S CTP を用いて BamHI 分解 pBS-GCX-1 からセンスプローブを転写した。次に、ラット卵巣を鋳型にはめ込み、ドライアイス中で凍結した。12~14 μm の厚さの切片をクリオスタットで作製し、*in situ* 融合のために APS をコートしたスライドグラス上に包埋した。融合前に切片をプロティナーゼ K を処置し、アセチル化した。³⁵S 標識 cRNA プローブとの融合は 60°Cで 6 時間行い、切片を高ストリンジエンシーで洗浄し、NTB3 乳化剤 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) を用いてオートラジオグラフ解析を行った。

その結果を第3図に示す。Aは8日齢、Bは21日齢、Cは成熟（発情間期）のラットの卵巢を摘出し、GCX-1の³⁵S標識アンチセンス鎖cRNAプローブと融合させたものを示す。Dは、21日齢ラットの卵巢の切片をセンス鎖cRNAプローブと融合させたものを示す。

5 第3図のAに示すように、非常に早期の前胞状段階の卵胞において強い信号が検出され、その発現は顆粒膜細胞層に限定していた。同様レベルの発現は2又はそれ以上の顆粒膜細胞層を有する僅かに進行した段階の卵胞でも観察された。第3図のBに示すように、大型前胞状と小型胞状段階の卵胞においてもその信号が検出されたが、更に進行した段階の大型胞状卵胞では非常に低レベルの発現が観察された。更に、第3図のCに示すように、その信号は黄体中では僅かしか検出されなかった。これらの所見は、GCX-1遺伝子発現は早期の発育段階の卵胞中の未分化顆粒膜細胞に限定されていることを示している。

実施例4

15 GCX-1に対する抗体を作製して、細胞中の内因性GCX-1蛋白を確認した。
NH₂-SLLHLGDHEAGYHSLC-CO₂Hペプチド配列（配列番号1のアミノ酸配列の39-54位）を用い、IgG精製によりGCX-1特異的ウサギポリクローナル抗血清を作製した。顆粒膜細胞を培養液5ml中に5×10⁶生細胞を含む60mmシャーレ中で無ホルモン条件下で24時間培養し、細胞をスクレーパーを用いて集め、磷酸緩衝食塩液(PBS)10mlで洗浄した。得られた細胞を1mlのPBS中に懸濁し、エッペンドルフ管内へ移し、4°C下で1500×g、10分間の遠心により、固形化した。既報(Nucleic Acid Res 17: 6419 (1989))に従って、顆粒膜細胞の細胞抽出物を作製した。細胞固型物を600μlの冷却緩衝液A(10mM HEPES, pH7.9; 10mM KCl; 1mM EDTA; 0.5mM EGTA; 1mM DTT; 及び0.5mM PMSF)中で静かにピペット処理することにより再懸濁した。細胞を15分間氷の上で膨張させ、その後、Nonidet P-40 10%液37.5μlを加え、10秒間強く攪拌した。得られたホモジネートを4°C下で5分間、17000×gで遠心した。上清を蛋白分析のための細胞質分画として用い、核固型物を40μlの氷冷緩衝液C(20mM HEPES, pH7.9; 0.4M NaCl; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 1mM DTT; 及び1mM PMSF)

中に再懸濁し、試験管を振盪台上で 4°C 15 分間強く振盪した。その混合液を 4°C 下で 15 分間 17000×g で遠心し、得られた上清を核分画として蛋白分析に使用した。GFP-GCX-1 融合蛋白を発現している HepG2 細胞から採取した核抽出物を同じプロトコールに従って作製した。細胞質と核抽出物（各 100 μg）を還元条件下で 10% アクリルアミドゲル上で SDS-PAGE により電気泳動を行った。蛋白を Immobilon-P ニトロセルロース膜 (Millipore Co., Bedford, MA) の方へ電気泳動により移動させ、ミルク緩衝液 (PBS-T [0.0001% の Tween-20 を含有する PBS] 中に 5% のスキムミルク添加) と、室温中で 1 時間、ミルク緩衝液中の IgG 純化 GCX-1 抗体 (0.019 μg/ml) とインキュベートすることにより 5
プロッキングを行った。膜を PBS-T を用いて洗浄し、ECL-Plus キット (Amercham Biosciences Co., Piscataway, NJ) を用いて、製造元の提示書に従って免疫反応性の GCX-1 蛋白を検出した。
10

その結果を第 4 図に示す。図中、A は GCX-1 特異的抗血清の解析を示す。pEGFP-C1E1-移入 (lane 1) 又は pEGFP-GCX-1 (-61-473) 移入 (lane 2)
15 HepG2 細胞の核抽出物を抗 GCX-1 血清 (IgG 精製を行った) によるウエスタンプロット解析に供した。1 本の GFP-GCX-1 融合蛋白に対する特異的バンドが示されている。B は、ラット卵巣の顆粒膜細胞における内因性 GCX-1 蛋白の検出を示す。培養顆粒膜細胞から細胞質 (lane 1) と核 (lane 2) 抽出物を作製し、同じ抗血清を用いてウエスタンプロット解析を行った。1 本の GCX-1 特異 20 的バンドが示されている。

第 4 図の A に示すようにポリクローナル抗体は効果的に GFP-GCX-1 蛋白 (lane 2) を認識した。免疫反応性の GCX-1 はラットの顆粒膜細胞の核抽出物中 (第 4 図の B、lane 2) でのみ検出されるが、細胞質分画中 (第 4 図の B、lane 1) では検出されない。

25

実施例 5

GCX-1 は核内蛋白であり、転写因子に典型的なモチーフの 1 種である HMG-box を有していることから、GCX-1 の転写活性について調べた。

GCX-1 蛋白の標的遺伝子が未だ不明であることから、GCX-1 の転写能を確認

するために GAL4 を基本とする非相同性ルシフェラーゼレポーターシステムを用いた。 pRL-CMV 1ng と 5×GAL4-E1b/Luc ホタルルシフェラーゼレポータープラスミド又は pGL3-基本レポータープラスミド 100ng を HepG2 細胞に同時移入した。第 5 図に記述した量の pSG-GCX-1 (-61-473) を同様に細胞内へ移入した。各試料中に等量の DNA を含むように GAL4 DBD のみを発現する pSG424 をある試料中へ添加した。

その結果を第 5 図に示す。 GAL4 DBD-GCX-1 融合蛋白の発現はレポータールシフェラーゼ活性を大きく増強させた。GCX-1 プラスミド 0.1ng を添加すると、約 25 倍のルシフェラーゼ活性の誘導を起こし、1ng のプラスミドは約 100 倍の誘導を起こした。一方、GAL4 結合配列を有しないレポータープラスミドを 5×GAL4-E1b/Luc の代わりに用いると、GCX-1 プラスミドの同時移入によっても誘導は見られなかった。これらの所見は GCX-1 は非常に強力な転写活性化因子であることを明確に示している。

15 実施例 6

次いで GCX-1 の相互活性化ドメインについて調べた。GAL4 DBD-GCX-1 欠損変異を有する各種のプラスミド構成物を作製し、pRL-CMV 1ng、5×GAL4-E1b/Luc レポータープラスミド 100ng 及び pSG-GCX-1 欠損各種変異体 1ng を HepG2 細胞に同時移入した。その結果を第 6 図に示す。

20 第 6 図に示すように、N 末端から 25-63 個のアミノ酸残基間の部位は GCX-1 の転写活性に必須であることが証明された。この部位は今までに報告されている典型的な転写活性化モチーフを含有していない。

請求の範囲

1. 以下の (a) 又は (b) から成る転写活性化因子。
 - (a) 配列番号 1 のアミノ酸配列から成るタンパク質
 - 5 (b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、転写活性化能を有するタンパク質
2. 請求項 1 に記載の転写活性化因子を有効成分とする、転写活性化を目的とする薬剤。
3. 請求項 1 に記載の転写活性化因子を特異的に認識し結合することができる
10 抗体又はアンタゴニスト。
4. 被検者から生殖系器官の細胞を採取する段階、及び採取した細胞に対する
請求項 3 に記載の抗体又はアンタゴニストの反応性を調べる段階から成る、生殖
系器官の異常に起因する疾患の検査方法。
5. 請求項 3 に記載の抗体又はアンタゴニストを有効成分とする、転写活性化
15 を目的とする薬剤のスクリーニング剤。
6. 以下の (a) 又は (b) から成る転写活性化因子の遺伝子。
 - (a) 配列番号 2 の塩基配列から成るDNA
 - (b) 配列番号 1 のアミノ酸配列から成るタンパク質、又は該アミノ酸配列にお
いて 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列か
20 ら成り転写活性化能を有するタンパク質をコードするDNA
7. 被検者から請求項 6 に記載の遺伝子に相当する部分を含むDNAを採取す
る段階、及び採取したDNAを請求項 6 に記載の遺伝子の塩基配列と比較する段
階から成る、生殖系器官の異常に起因する疾患の検査方法。

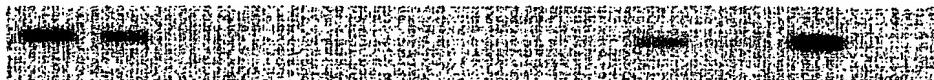
1/4

第 1 図

1 MSDGNPELLSTSQTYSQGESNEDYEIPPIPPNLPEPSLLHLGDHEAGY 50
 51 HSLCHGLAPNGLLPAYSYQAMDLPAIMVSNMLAQDGHLLSGQLPTIQEMV 100
 101 HSEVAAYDSGRPGPLLGRPAMLASHMSALSQSQLISQMGLRSGIAHSSPS 150
 151 PPGSKSATPSPSSSTQEEESDAHFKISGEKRPSTDGKKAKNPKKKKKD 200
 201 PNEPQKPVSA~~Y~~ALFFRDTQAAIKGQNPSATFGDVSKIVASMWD~~S~~LGE~~E~~QK 250
 251 QAYKRKTEAAKKEYLKALAAYRASLVS~~K~~SPPDQGEAKNAQANPPAKMLPP 300
 301 KQPMYAMPGLASFLTPSDLQAFRSAASPASLARTLGSKALLPGLSTSPPP 350
 351 PSFPLSPSLHQQLPLPPHAQGTLLSPPLSMSPAPQPPVLPAPMALQVQLA 400
 401 MSPSPPGPQDFPHISDFPSGSRS~~G~~SPGPSNPSSGDWDGSYPSGERGLGT 450
 451 CRLCRSSPPP~~T~~TS~~P~~KNLQE~~P~~SAR 473

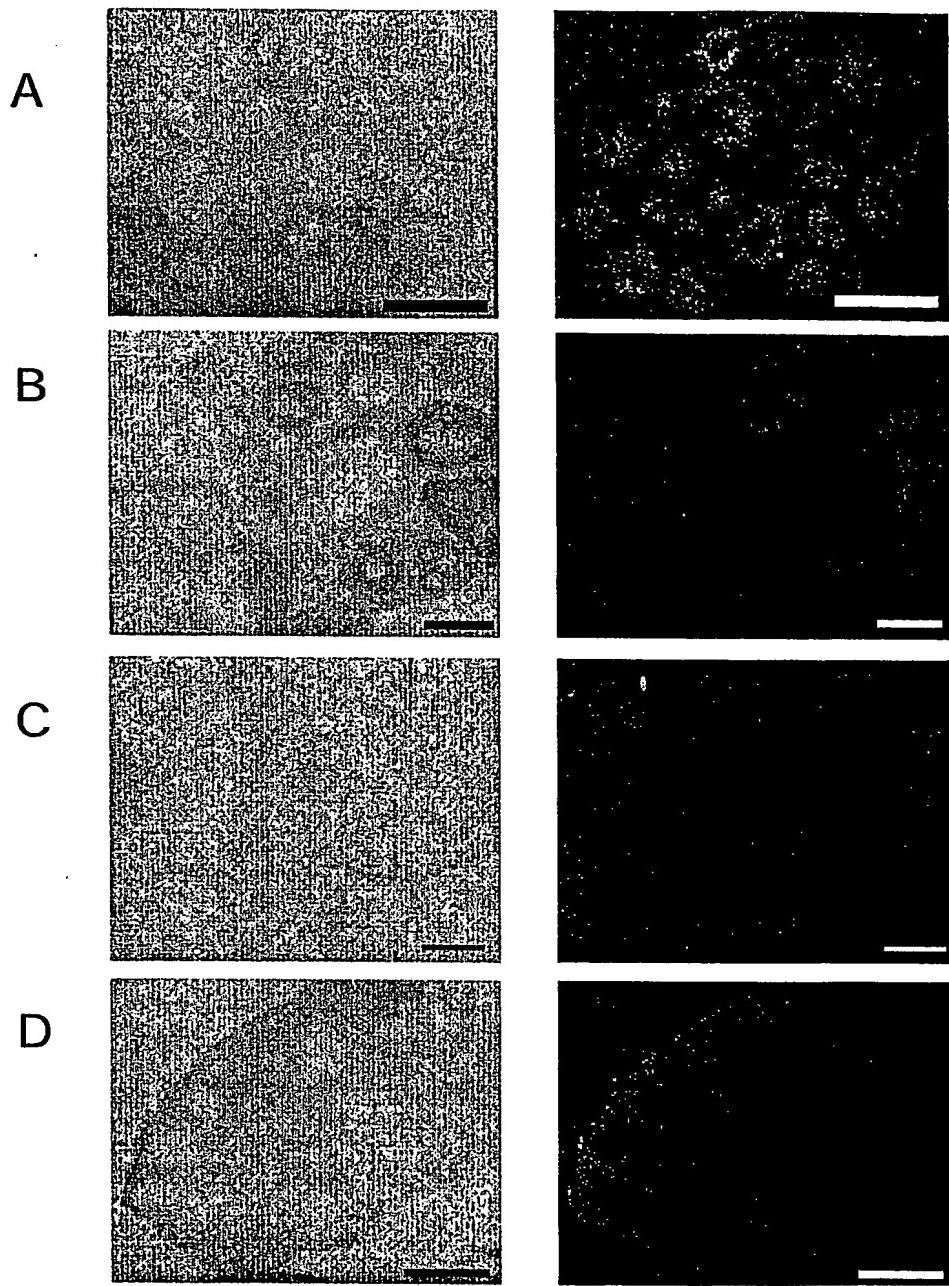
第 2 図

GCX-1



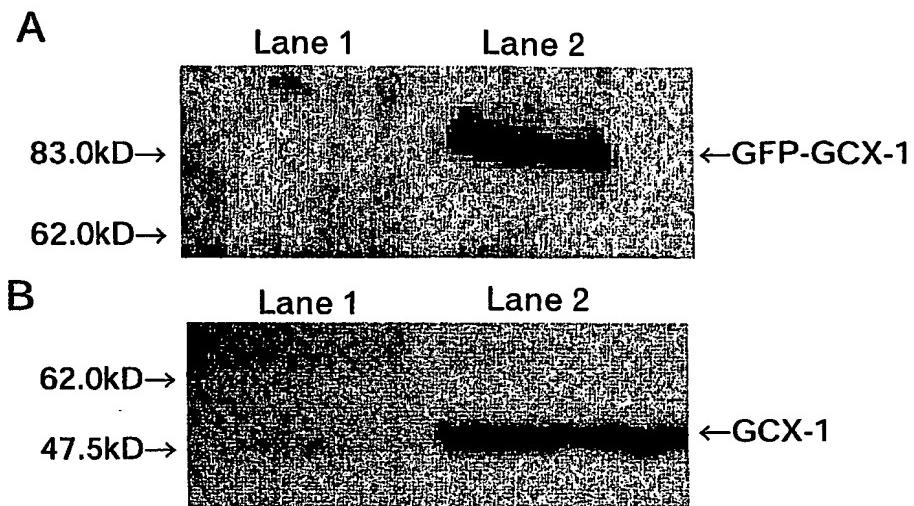
2/4

第3図

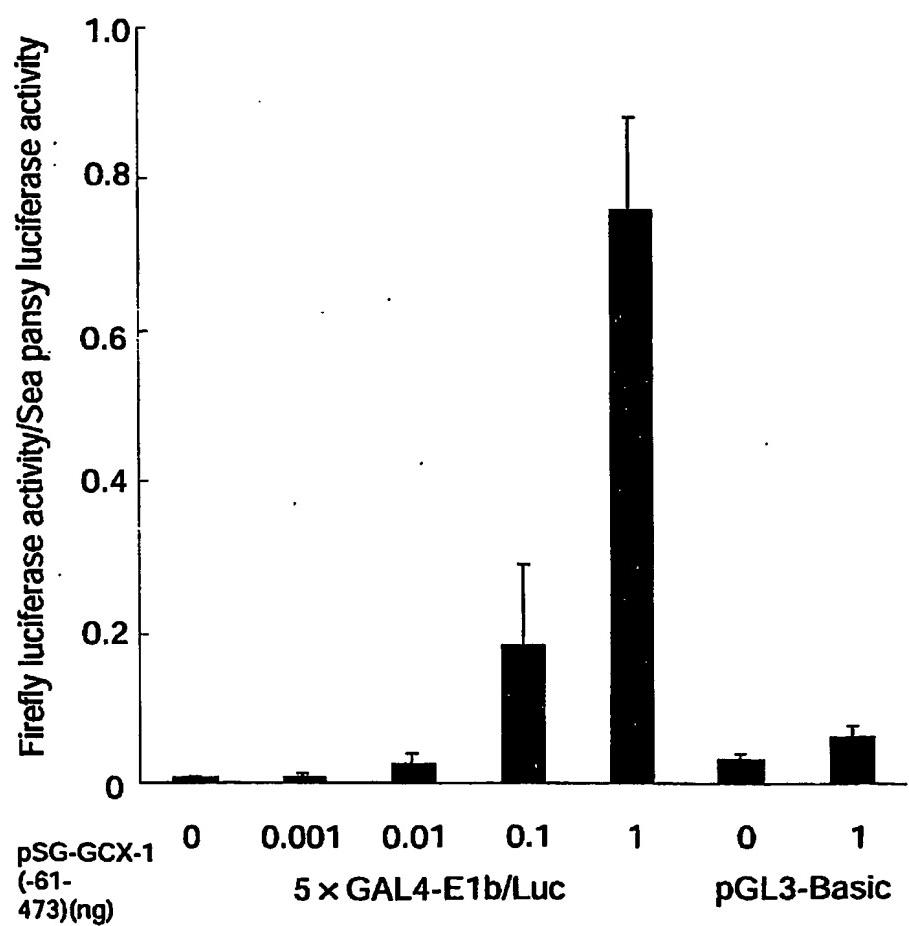


3/4

第4図

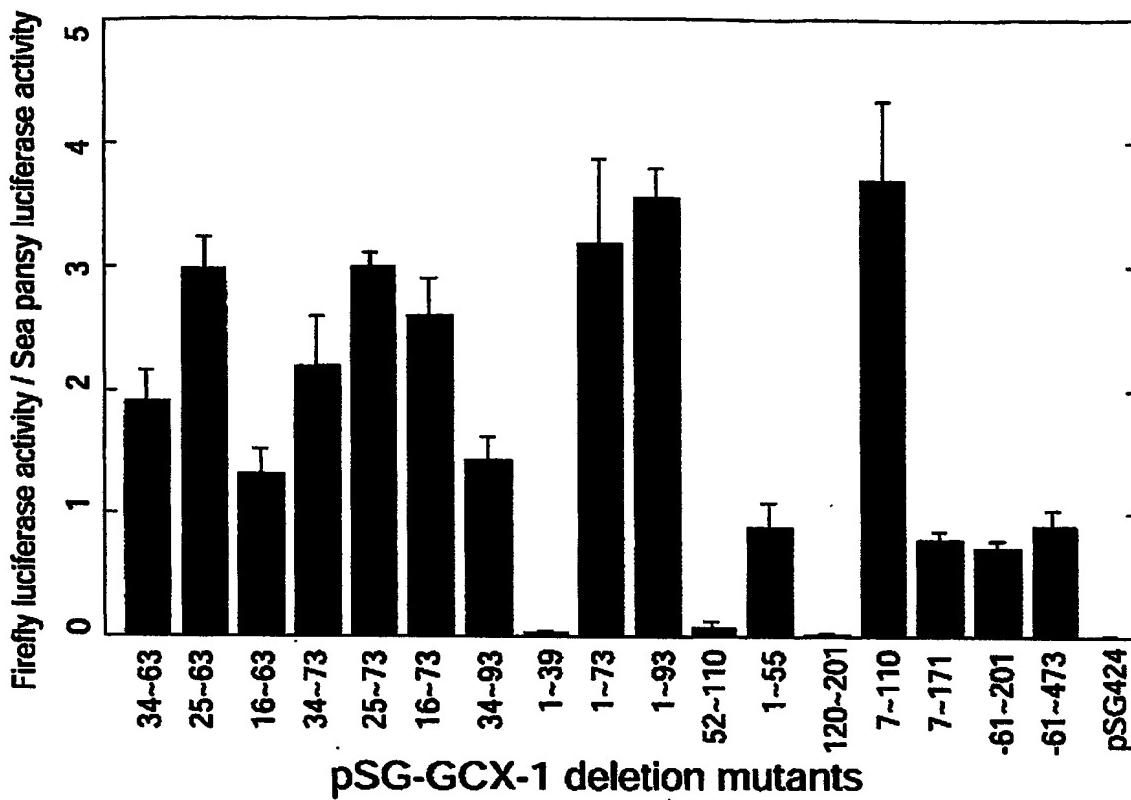


第5図



4/4

第6図



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> 転写活性化因子

<130> FS03-324PCT

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 473

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 1

Met Ser Asp Gly Asn Pro Glu Leu Leu Ser Thr Ser Gln Thr Tyr Asn

1 5 10 15

Ser Gln Gly Glu Ser Asn Glu Asp Tyr Glu Ile Pro Pro Ile Thr Pro

20 25 30

Pro Asn Leu Pro Glu Pro Ser Leu Leu His Leu Gly Asp His Glu Ala

35 40 45

Gly Tyr His Ser Leu Cys His Gly Leu Ala Pro Asn Gly Leu Leu Pro

50 55 60

Ala Tyr Ser Tyr Gln Ala Met Asp Leu Pro Ala Ile Met Val Ser Asn

65 70 75 80

Met Leu Ala Gln Asp Gly His Leu Leu Ser Gly Gln Leu Pro Thr Ile

85 90 95

Gln Glu Met Val His Ser Glu Val Ala Ala Tyr Asp Ser Gly Arg Pro

100 105 110

Gly Pro Leu Leu Gly Arg Pro Ala Met Leu Ala Ser His Met Ser Ala

115 120 125

Leu Ser Gln Ser Gln Leu Ile Ser Gln Met Gly Leu Arg Ser Gly Ile

130 135 140

2 / 4

Ala His Ser Ser Pro Ser Pro Pro Gly Ser Lys Ser Ala Thr Pro Ser
145 150 155 160

Pro Ser Ser Ser Thr Gln Glu Glu Glu Ser Asp Ala His Phe Lys Ile
165 170 175

Ser Gly Glu Lys Arg Pro Ser Thr Asp Pro Gly Lys Lys Ala Lys Asn
180 185 190

Pro Lys Lys Lys Lys Lys Asp Pro Asn Glu Pro Gln Lys Pro Val
195 200 205

Ser Ala Tyr Ala Leu Phe Phe Arg Asp Thr Gln Ala Ala Ile Lys Gly
210 215 220

Gln Asn Pro Ser Ala Thr Phe Gly Asp Val Ser Lys Ile Val Ala Ser
225 230 235 240

Met Trp Asp Ser Leu Gly Glu Glu Gln Lys Gln Ala Tyr Lys Arg Lys
245 250 255

Thr Glu Ala Ala Lys Lys Glu Tyr Leu Lys Ala Leu Ala Ala Tyr Arg
260 265 270

Ala Ser Leu Val Ser Lys Ser Pro Pro Asp Gln Gly Glu Ala Lys Asn
275 280 285

Ala Gln Ala Asn Pro Pro Ala Lys Met Leu Pro Pro Lys Gln Pro Met
290 295 300

Tyr Ala Met Pro Gly Leu Ala Ser Phe Leu Thr Pro Ser Asp Leu Gln
305 310 315 320

Ala Phe Arg Ser Ala Ala Ser Pro Ala Ser Leu Ala Arg Thr Leu Gly
325 330 335

Ser Lys Ala Leu Leu Pro Gly Leu Ser Thr Ser Pro Pro Pro Pro Ser
340 345 350

Phe Pro Leu Ser Pro Ser Leu His Gln Gln Leu Pro Leu Pro Pro His
355 360 365

Ala Gln Gly Thr Leu Leu Ser Pro Pro Leu Ser Met Ser Pro Ala Pro

3 / 4

370 375 380

Gln Pro Pro Val Leu Pro Ala Pro Met Ala Leu Gln Val Gln Leu Ala

385 390 395 400

Met Ser Pro Ser Pro Pro Gly Pro Gln Asp Phe Pro His Ile Ser Asp

405 410 415

Phe Pro Ser Gly Ser Gly Ser Arg Ser Pro Gly Pro Ser Asn Pro Ser

420 425 430

Ser Ser Gly Asp Trp Asp Gly Ser Tyr Pro Ser Gly Glu Arg Gly Leu

435 440 445

Gly Thr Cys Arg Leu Cys Arg Ser Ser Pro Pro Pro Thr Thr Ser Pro

450 455 460

Lys Asn Leu Gln Glu Pro Ser Ala Arg

465 470

<210> 2

<211> 1419

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

atgagtgcac gaaatccaga gctcctgtca accagccaga cctataacag ccagggcgag	60
agcaacgaag actatgagat ccctcctata acacctccca atctccctga gccatccctc	120
ctgcacctgg gggaccacga agccggttac cactcactgt gtcacggct tgccccaaac	180
ggtctgtccc ccgcctactc gtaccaggca atggatctcc cggccatcat ggtgtccaac	240
atgctggccc aggatggcca cctgctgtca ggacagctgc ccacgatcca ggaaatggtc	300
cactcggagg tagctgccta tgactcaggc cggccagggc ccctgctggg cggccctgcg	360
atgctggcca gccacatgag tgcctcagt caatcccagc tcatctccca gatggccctc	420
cggagtggca ttgcccacag ctccccatca cccccaggga gcaagtca gatccccgtct	480
ccatccagct ccacccagga ggaggagtca gatgccatt tcaagatttc aggagagaag	540
agaccctcaa cagaccagg caaaaaggcc aaaaatccaa agaagaagaa gaagaaggat	600
cccaatgagc cacagaagcc agtgtcgcc tacgctctt tcttcagaga cactcaggct	660

4 / 4

gccatcaagg ggcagaaccc cagtgccacc tttggggatg tttccaaaat tgtggcctcc	720
atgtggaca gcctggaga agagcagaaa caggcgtata agaggaagac cgaagctgcc	780
aagaaggagt acctgaaagc cttggcgccc tacagagcta gcctcgtgtc caagagcccc	840
ccggaccaag gcgaggccaa gaacgctcag gcaaaccac cagccaaaat gcttccaccc	900
aagcagccca tgtacgccc cat gcccgcctg gtttcatttc tgacgccctc cgacctgcag	960
gctttccgca ggcgcgcctc tcctgccagc ctgcgcagaa cgctggctc caaggccctg	1020
ctgccaggcc tcagcaccc cccaccacca ccctcatttc ctctcagccc ctccattgcac	1080
cagcagctgc cactgccacc ccacgcgcag ggtaccctcc tcagccgcctc tctcagcatg	1140
tccccagccc cgccgcctcc tgtcctgcct gccccatgg cactccaggt gcagctggcg	1200
atgagccctt cgccctccagg gccacaggac tttccacaca tctctgactt ccccaagtggc	1260
tctggctccc gtcacactgg cccatccaac cttccagca gcggggactg ggatggaggt	1320
taccccagtg gggagcgcgg cctggcacc tgcagactct gcagaaggcag cccaccgccc	1380
accaccagcc caaagaacct gcaggaacct tctggccgc	1419

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 3

cccaatgagc cacagaagcc a	21
-------------------------	----

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 4

ggaaaggcctg caggtcgagg	20
------------------------	----